

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the Role of Janus Kinase 2 in Cytokine Receptor Signal Transduction

和訳 サイトカイン受容体シグナル伝達における Jak2 キナーゼの役割の解析

指導教官：新井 賢一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月進学

博士後期課程

分子細胞生物学専攻

MD. GOLAM MOHI (MD. グラム モヒ)

IL-3, GM-CSFは種々の血球系細胞の増殖、分化、生存を制御する重要な因子である。IL-3, GM-CSFのレセプターは α 、 β サブユニットからなり、 α サブユニットはそれぞれのサイトカインに特異的であるが、 β サブユニットはIL-3, GM-CSF, IL-5に共有されている(βc :common)。 β サブユニットはシグナル伝達に重要な役割を果たしている。 βc は自分自身にキナーゼ活性を持っていないが、膜貫通領域直下の部分でJak2と会合している。Jak2はIL-3, GM-CSFのシグナル伝達に重要な働きをしている。IL-3, GM-CSFの刺激後、Jak2はリン酸化を受け活性化され、 βc のチロシン残基をリン酸化する。これにより、Stat5, Shc, SHP-2, Vav, c-CblなどのSH2蛋白質やPTB領域を持つ蛋白質の会合が可能になる。続いてJak/Stat, Ras/Raf/MAPK, PI3K/Aktなどの複数のシグナル伝達経路が活性化を受け、血液細胞の増殖や分化が制御される。

Jak2の活性はGM-CSFのすべての活性に必要であることが明らかである。優勢劣勢変異型Jak2の発現は増殖やc-myc, c-fosの活性化を阻害する。 βc における種々の変異体の活性化からbox1領域は検討を加えたGM-CSF活性のすべてに必須であり、そのことはJak2との会合にbox1が必要であることから説明されると考えられている。Jak2の下流は少なくとも二つの異なるシグナル経路があることが予想されている。一つは βc のチロシンリン酸化に依存している経路、もう一つはレセプターの関与なしにJak2から直接に活性化される経路である。

サイトカインシグナル伝達におけるJak2の役割を解析するため、増殖因子によるレセプターへの関与からJak2の活性を単離する必要がある。そこで本研究では、1分子のクママイシンが2分子のGyrBと会合することで、GyrBの二量体化を引き起こす、クママイシン・GyrBシステムを導入し、Jak2がクママイシン添加によって、二量体化が誘導されるようにするための3つの異なるタイプのGyrB/Jak2融合蛋白質を構築した。GNJKはGyrBがJak2のJH2/JH1フラグメントの5'側に融合したもの、GIJWはGyrBが完全長のJAK2のJH2とJH3の間に挿入されたもの、GNJWは完全長のJak2の5プライム側にGyrBが融合したものである(図1)。

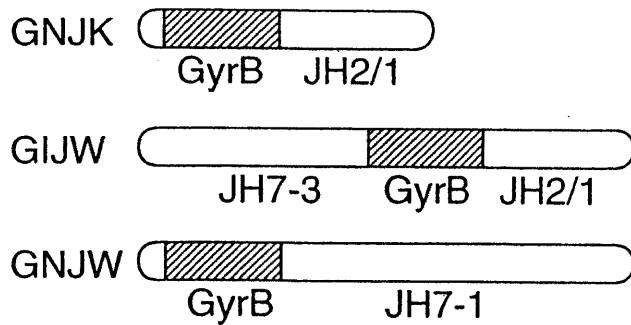


図1 GyrB-Jak2の構造。GNJKはGyrBがJak2のJH2/JH1フラグメントの5'側に融合したものの、GIJWはGyrBが完全長のJAK2のJH2とJH3の間に挿入されたもの、GNJWは完全長のJak2の5'側にGyrBが融合したものである。

結果、クマイシンはGNJKとGIJWのチロシンリン酸化を誘導した。その際、内在性のJak2はリン酸化を受けなかった。いずれの場合も最も高い活性化は1 μ Mのクマイシンで得られた(図2)。それ以上の濃度ではリン酸化のレベルはむしろ下がっており、このことはクマイシンが融合蛋白質のリン酸化を二量体化によって引き起こしていることが示唆された。しかしクマイシンの刺激は β cのリン酸化は引き起こさなかった。この結果はクマイシンによるGyrB-Jak2の活性化がレセプターの活性化をバイパスしていることを示唆していた。

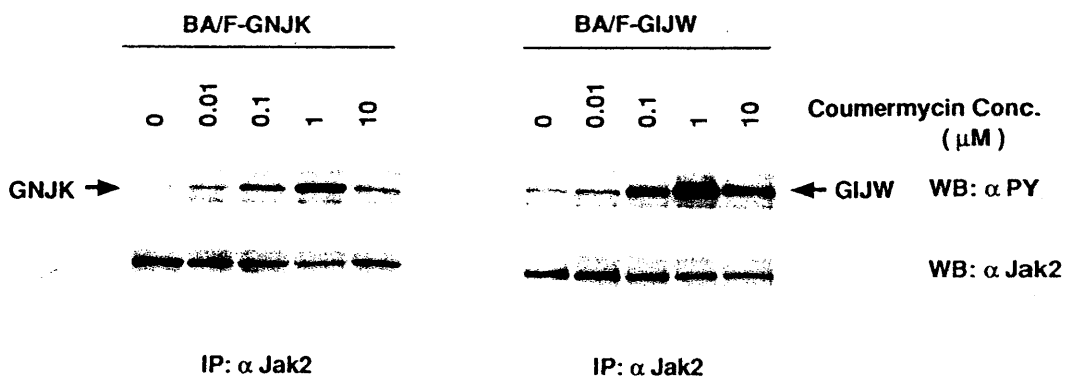


図2 GyrB-Jak2のクマイシンによるチロシンリン酸化。ファクターを抜いたBA/F-GNJK、BA/F-GIJW細胞を15分間刺激した。

次にクマイシンにより活性化されたGyrB-Jak2でどのような分子がチロシンリン酸化を受けるのか検討を加えた。BA/F-GIJWではSTAT5がmIL-3での刺激時と同様にリン酸化を受けたが、BA/F-GNJKでは観察されなかった。従って、Jak2のJH3-JH7がキナーゼ領域やシュードキナーゼ領域に加えてSTAT5のリン酸化に必要であることが明らかになった。しかしいずれの細胞でもSTAT5以外のSTATはmIL-3、クマイシンいずれの刺激によってもリン酸化を受けることがなかった(図3)。

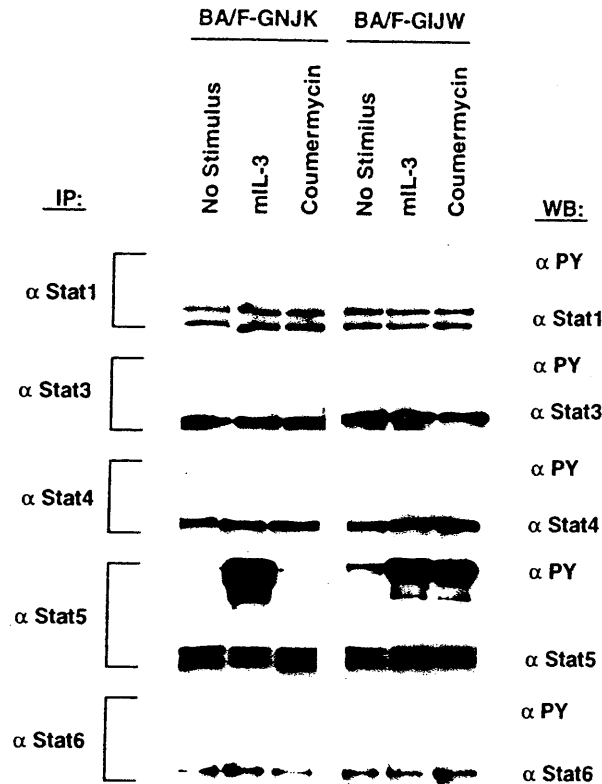


図3 クママイシンによるSTAT5の活性化。BA/F-GNJK, BA/F-GIJW細胞をファクターを6時間除き、mIL-3, クママイシン(1 μ M)で15分間刺激した。細胞は各種のSTATの抗体を用いて免疫沈降にかけた。

mIL-3はSHP-2やShcのチロシンリン酸化を起す。一方、クママイシン刺激はいずれの細胞でもこれらの分子のチロシンリン酸化を起すことはなかった。一過性発現系でみた、c-fosプロモーターの活性化も活性化を受けることがなかった。従って、これらの結果はGyrB-Jak2融合蛋白の活性化がRas/MAPキナーゼ経路の活性化に充分ではないことが予測された。

次に増殖活性化についてチミジンの取り込みで観察した。クママイシン刺激によってチミジンの取り込みはGIJW細胞では観察されGNJK細胞では観察されなかったが、その取り込みはmIL-3で観察されるものよりもレベルが低かった。

Jak2はBA/F3細胞においてアポトーシスを抑制するのに重要な役割を果たしていることが明らかであるが、Jak2の活性化がアポトーシスの阻害に充分であるのかどうかは明らかでなかった。そこでクロモゾームDNAの断片化を指標にGyrB-Jak2のアポトーシスへの効果を検討した。DNA断片化はmIL-3存在下では起こらないが、クママイシン存在下ではチミジンの取り込みが観察されたGA/F-GIJW細胞においても見いだされた。従って、GyrB-Jak2融合蛋白質はアポトーシスの阻害には充分でないことがわかった。

Bcl-XLなどBcl-2ファミリーの蛋白質は血球細胞でアポトーシスの抑制に重要な役割を果たしている。NF-IL-3も同様の活性が報告されている。クママイシンによるGyrB-Jak2の活性化がファクターデプリージョンによるアポトーシスを抑制できなかったため、これらの分子の発現をRT-PCRで確認した。クママイシン刺激はいずれの細胞でもBcl-XL, BCL-2, NFIL3ともに誘導することができなかった。従って、GyrB-Jak2がアポトーシスを抑制できない理由はこれによるであろうと考えられた。

しかしながら、Bcl-XLの過剰発現はBA/F-GIJW細胞においてファクターデプリージョンあるいはガンマ線照射によるアポトーシスを抑制した。

本研究においてJak2の活性化とその役割について検討した。この目的のためGyrB-Jak2キメラ蛋白質を構築し、レセプターの関与なしにクママイシンで活性化できる系を構築した。クママイシンが

GyrB-Jak2 のリン酸化を誘導できることを見出し、従って二量体化が Jak2 の活性化にとって重要であることが明らかになった。GyrB-Jak2 が活性化されても βc はリン酸化を受けず、また、SHP-2, Shc もリン酸化を受けなかったが、これはレセプターがリン酸化を受けていないためと予想された。そこで Jak2 のレセプター非依存性のシグナルを単離することに成功した。

本研究で GyrB-Jak2 が特異的に STAT5 を活性化することを見出した。他の STAT は活性化されなかったが、このことはキメラ蛋白質がある程度基質特異性をもっていることを示唆している。

またクマイシンは GyrB-Jak2 による細胞増殖を引き起こすことが明らかになった。しかし、そのレベルは低く、しかも一過性であった。このことは複数のシグナル伝達経路が血球系細胞の増殖には必要で、Jak2-Stat5 経路はそのうちのひとつであることが示唆されている。おそらく複数の経路の活性が総合して長期的な増殖が実現するのであろう。

ファクターデプリージョンによるアポトーシスはクマイシン存在下でも起こったことから、GyrB-Jak2 はアポトーシスの抑制に不十分であることが明らかになった。また、c-myc, pim-1, CIS は Jak2 が Ba/F-GIJW 細胞でクマイシンによって誘導されたことから、これらの遺伝子が Jak2 の標的であることが明らかになった (図4)。gp130 では pim-1, c-myc は増殖やアポトーシス抑制に重要な働きを持つことが示唆されているが、 βc のシグナル伝達では異なるようである。この場合は、アポトーシス抑制には作用しないが、短期の増殖には関与していることが示唆された。

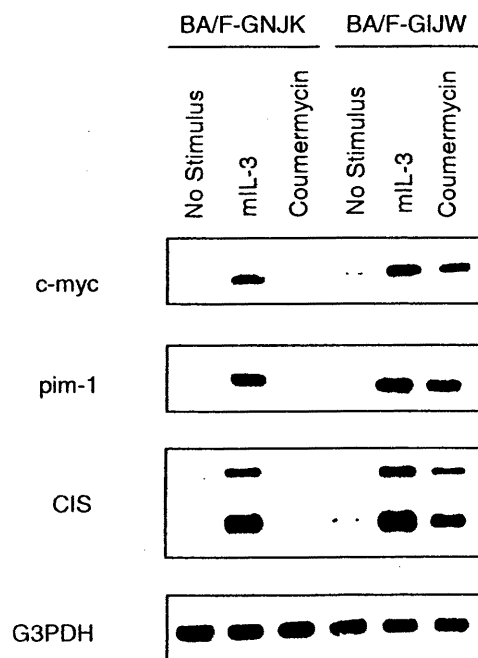


図4 クマイシンによる c-myc, pim-1, CIS の活性化。BA/F-GNJK, BA/F-GIJW 細胞を 5 時間ファクターを抜いて mIL-3, クマイシンで 30 分間刺激した。c-myc, pim-1, CIS, G3PDH をプローブに用いてノザン解析を行なった。

Bcl-XL, NFIL-3 は IL-3 依存性細胞の生存に重要であることが報告されている。Jak2/STAT5 の選択的活性化ではこれらの遺伝子の活性化を起すことができなかった。従って Bcl-XL の活性化には STAT5 と他の分子との相乗的な作用を必要とすることが示唆された。Bcl-XL の過剰発現によるファクターデプリージョンやガンマ線照射によるアポトーシスの抑制で Bcl-XL の抗アポトーシス効果が確認された。

Jak2 の N 末端領域が STAT5 の活性化や他の分子の活性化に必要であることが明らかになった。この領域はサイトカインレセプターとの会合に重要であることが示されているが、他のシグナル伝達分子との会合や活性化にも必要であることが示唆された。